



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**VANESSA MORESCO**

**DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS EM AMOSTRAS DE ÁGUAS DE SUPERFÍCIE**  
**ATRAVÉS DE TÉCNICAS MOLECULARES E DE CULTIVO CELULAR**

**Florianópolis**

**2008**

**VANESSA MORESCO**

**DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS EM AMOSTRAS DE ÁGUAS DE SUPERFÍCIE  
ATRAVÉS DE TÉCNICAS MOLECULARES E DE CULTIVO CELULAR**

**Trabalho realizado como requisito para  
a obtenção do título de Bacharel em  
Ciências Biológicas, referente à  
disciplina Estágio II (BIO 5156) do  
currículo do Curso de Graduação em  
Ciências Biológicas.**

**Orientadora: Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões**

**Florianópolis**

**2008**

## AGRADECIMENTOS

- À Profa. Célia Barardi pela orientação, amizade e paciência durante a realização deste trabalho e nos anos de estágio no Laboratório de Virologia Aplicada.
- À Profa. Cláudia Simões pelas valiosas sugestões durante a etapa final deste trabalho.
- Aos avaliadores deste trabalho, Prof. Afonso Bainy, Prof. Aguinaldo Pinto e Cristiane Kolesnikovas, pela disponibilidade.
- À Caroline Rigotto pela co-orientação desde o início da realização deste projeto.
- À Caroline Rigotto, Cristiane Kolesnikovas, e Matías Montero pela parceria durante este trabalho.
- Aos atuais colegas e ex-colegas do laboratório, pela ajuda, sugestões e conversas no cafezinho da tarde: Adriana, Aline, Carla, Caroline, Cristian, Cristiane, Débora. Deise, Érica, Francielle, Izabella, Jadel, Jéssica, Jonas, Luciane, Marina, Matías, Thiago.
- Aos demais colegas dos laboratórios do 3º andar do MIP.
- Aos inesquecíveis colegas e amigos Caroline, Ethel e Jonas, pelos momentos de bom humor e os de mau também.
- Às companheiras de apartamento, Débora e Vanessa, e ao meu namorado Daniel.
- À minha mãe Ana e meu irmão Daniel pelo apoio incondicional e amor.

## ÍNDICE

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Aspectos Gerais.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Rotavírus.....</b>	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>11</b>
<b>3.</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1</b>	<b>Cultivo de células MA104.....</b>	<b>12</b>
<b>3.2</b>	<b>Produção de fluido viral de Rotavírus SA11.....</b>	<b>12</b>
<b>3.3</b>	<b>Titulação do fluido celular infeccioso de rotavírus SA11 por imunofluorescência indireta (IFA).....</b>	<b>13</b>
<b>3.4</b>	<b>Amostras de águas para padronização.....</b>	<b>15</b>
<b>3.5</b>	<b>Concentração das amostras de águas através do método Centriprep™.....</b>	<b>15</b>
<b>3.6</b>	<b>Extração do RNA viral a partir da suspensão viral e das amostras de águas concentradas.....</b>	<b>18</b>
<b>3.7</b>	<b>Padronização do RT-PCR das amostras de águas concentradas.....</b>	<b>19</b>
<b>3.8</b>	<b>Ensaio de citotoxicidade das amostras concentradas de águas.....</b>	<b>20</b>
<b>3.8.1</b>	<b>Verificação da viabilidade das partículas virais recuperadas pelo ensaio de ICC-RT-PCR Cultura celular integrada).....</b>	<b>21</b>
<b>3.9</b>	<b>Verificação de contaminação viral em águas coletadas (estudo de campo).....</b>	<b>22</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>Titulação do fluido viral de rotavírus SA11 por imunofluorescência indireta (IFA).....</b>	<b>24</b>
<b>4.2</b>	<b>Padronização do método de concentração e detecção de rotavírus para amostras de água destilada, água do mar e esgoto tratado.....</b>	<b>25</b>
<b>4.3</b>	<b>Detecção de rotavírus nas amostras de campo.....</b>	<b>27</b>
<b>4.4</b>	<b>Citotoxicidade das amostras de águas concentradas.....</b>	<b>28</b>
<b>4.5</b>	<b>Resultados para a verificação da viabilidade viral pelo ensaio de ICC-RT-PCR.....</b>	<b>28</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>39</b>

## RESUMO

Atualmente a contaminação do ambiente aquático e conseqüentemente dos recursos hídricos, vêm tomando importância frente à preocupação com a escassez da água. Diariamente, diferentes tipos de reservatórios de águas estão sendo saturados por contaminantes das mais diversas fontes, tornando as águas impróprias para consumo, para o desenvolvimento de atividades agrícolas e para recreação. Grande parcela da população que não possui tratamento adequado dos efluentes sendo as que mais sofrem com este problema, uma vez que são os principais atingidos por doenças de veiculação hídrica. Entre os principais contaminantes do ambiente aquático estão os vírus entéricos, responsáveis pela maioria de casos das doenças diarreicas no mundo, além de algumas formas de hepatites como também otites e conjuntivites, entre outras doenças. Os vírus entéricos infectam o homem através da via fecal-oral e replicam-se no trato gastrointestinal, causando as conhecidas gastroenterites. Dentre os vírus entéricos mais relevantes estão os rotavírus, que causam anualmente milhares de casos de diarreias em todo o mundo, principalmente em crianças com idade de até cinco anos. Os rotavírus possuem uma enorme variabilidade de sorotipos circulantes, sendo que a detecção da presença dos mesmos em diferentes tipos de águas de superfície se torna de alta importância uma vez que pode contribuir para futuros estudos epidemiológicos e evidenciar a necessidade do tratamento adequado dos efluentes despejados nos reservatórios aquáticos. O desenvolvimento de métodos para o monitoramento da qualidade sanitária da água se faz necessário para assegurar a qualidade da água distribuída à população, uma vez que os padrões de qualidade atuais, baseados nos níveis bacterianos, não possuem uma boa correlação com contaminação viral. Sendo assim, o presente trabalho de conclusão de curso teve por objetivo principal padronizar métodos de detecção de contaminantes virais em águas de superfície utilizando os rotavírus como modelo viral. A escolha de diferentes tipos de águas analisados durante o trabalho (amostras de campo) foi de grande importância uma vez que permitiu verificar se tal metodologia possui eficácia na detecção de contaminantes virais entéricos. Os métodos de detecção envolveram inicialmente a concentração viral por filtração, extração do material genético pelo método da sílica e posterior detecção por técnicas de RT-PCR e técnicas de cultura celular, esta última permitindo inclusive avaliar a viabilidade das partículas virais. Os resultados demonstraram que a metodologia empregada neste trabalho foi de grande eficiência em relação à detecção do genoma do rotavírus pela reação de RT-PCR. A utilização da água destilada foi a que resultou no melhor índice de recuperação viral (100%). Para os demais tipos de águas (água do mar e esgoto tratado), os resultados de recuperação viral foram pouco expressivos, uma vez que nestes tipos de amostras há a presença de diversos inibidores da reação de RT-PCR. Nas análises das amostras de campo, os resultados indicam que a metodologia utilizada propiciou uma detecção eficiente do genoma do rotavírus em diversas amostras, sendo algumas destas positivas em diversas análises ao longo de um ano de coleta. Das amostras positivas para a presença do genoma do rotavírus que foram submetidas ao ensaio de ICC-RT-PCR, duas amostras de esgoto da localidade do córrego do bairro Monte Verde foram positivas, o que demonstra a diminuta viabilidade do rotavírus em águas de superfície. A continuidade deste trabalho, com a realização da reação de PCR em tempo real das amostras de campo analisadas, permitirá melhores respostas, uma vez que a quantificação viral mostrará a real perda que ocorreu durante a utilização do método de filtração e concentração viral.

**Palavras-chave:** detecção de rotavírus, RT-PCR, águas de superfície, concentração e recuperação viral, ICC-RT-PCR

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1 Aspectos Gerais**

Recentemente a grande preocupação em torno da escassez dos recursos hídricos e o problema acerca da poluição ambiental têm evidenciado a necessidade de promover o uso racional da água. Este fato já chama a atenção de todo o mundo e é assunto nas mais diversas esferas sociais e políticas. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, o Brasil possui 168.870m<sup>3</sup> de recursos hídricos superficiais, o que representa 50% do total de recursos da América do Sul e 11% dos recursos mundiais (IBGE, 2000). Os ecossistemas aquáticos sofrem com o despejo de diferentes efluentes, provenientes das mais diferentes atividades humanas, entre essas se destacam atividades industriais, agrícolas e domésticas, que comprometem desta forma a saúde dos organismos aquáticos e a qualidade da água para consumo humano (PETROVIC et al., 2003).

A qualidade da água e, portanto da saúde humana, pode ser significativamente afetada pela presença de microrganismos entéricos patogênicos derivados de esgoto não tratado descartado em águas superficiais. Estima-se que no mundo 2,4 bilhões de pessoas não dispõem de tratamento de água. Como consequência, existe uma significativa morbidade e mortalidade, devido a doenças causadas por microrganismos presentes na água (STRAUB & CHANDLER, 2003). No Brasil, somente cerca de 52,2% dos municípios possuem coleta de esgoto (IBGE, 2000).

Dos agentes patogênicos presentes na água, o impacto causado pela contaminação pelos vírus entéricos é menos estudado do que o causado por bactérias e protozoários, principalmente devido à dificuldade em se detectar estes agentes em águas ambientais (WYN-JONES & SELLWOOD, 2001). Os vírus entéricos presentes naturalmente no

ambiente aquático são eliminados em grandes quantidades juntamente com as fezes ( $10^8$  a  $10^{11}$  partículas virais por grama de fezes) sendo capazes de contaminar direta ou indiretamente águas destinadas ao consumo humano, sobrevivendo no ambiente com relativa estabilidade se as águas não forem adequadamente tratadas levando à ocorrência de doenças em indivíduos susceptíveis (WYN-JONES, SELLWOOD, 2001; LECLERC et al., 2002; ASHBOLT, 2004). Estes vírus são normalmente introduzidos através de atividades humanas pelo uso de sistemas de fossas sépticas, pela presença de resíduos de atividades urbanas, agrícolas e pelo despejo de esgoto não tratado em águas estuarinas, de rios e de mar (FONG & LIPP, 2005).

Surtos de doenças entéricas virais por veiculação hídrica têm sido descritos em muitos países e a lista de microrganismos potencialmente patogênicos aumenta anualmente (STRAUB & CHANDLER, 2003). Estes vírus são altamente estáveis no ambiente aquático, possuem certa resistência aos agentes físicos e químicos de inativação, podem permanecer viáveis ou potencialmente infectantes durante meses na água, resistindo a condições ambientais diversas e a processos de tratamento de água e esgoto normalmente destinado ao controle bacteriano. Além disso, podem agregar-se a partículas sólidas do meio aquático, promovendo maior estabilidade (MARQUES, 1991; LECLERC et al., 2002; TREE et al., 2003; SKRABER et al., 2004).

A pesquisa de vírus em águas tratadas e não tratadas constitui uma relevante linha de investigação em desenvolvimento no mundo, visando à garantia da qualidade da água de uso da população. É recomendado que os laboratórios se preparem para tornar rotineira a análise de contaminação das águas contaminadas por vírus entéricos e pelos protozoários *Cryptosporidium parvum* e *Giardia* spp., já que esses parâmetros serão em breve requeridos como indicadores de potabilidade das águas (ANVISA, 2004). Atualmente, o controle da

qualidade da água é feito com base na presença de microrganismos indicadores como coliformes totais e fecais. Entretanto, não existe uma correlação entre os padrões bacterianos e a ausência de vírus entéricos no ambiente aquático.

Os vírus entéricos humanos capazes de persistirem no ambiente incluem, entre outros, os adenovírus, calicivírus, enterovírus e hepatovírus, sendo que são usualmente transmitidos através da via fecal oral e replicam-se no trato gastrointestinal do hospedeiro (FONG & LIPP, 2005). A dose infectante desses agentes é extremamente baixa variando de uma a dez unidades infecciosas (ASHBOLT, 2004).

Entre estes, estão os rotavírus que constituem um dos principais agentes etiológicos de diarreia tanto em crianças como em jovens, em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Aproximadamente 50% dos episódios anuais causam mortalidade em um número de 600.000 de crianças por ano (ARIAS et al., 2008). Somente os rotavírus A são responsáveis por 111 milhões de episódios de gastroenterites, 25 milhões de visitas ambulatoriais, 2 milhões de hospitalizações e mais de 352.000 a 592.000 mortes de crianças menores de cinco anos, principalmente na África, América Latina e Ásia (PARASHAR et al., 2003).

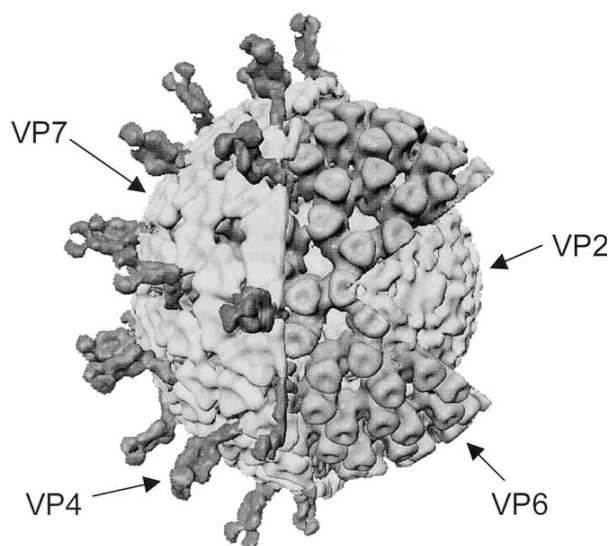
Surtos epidemiológicos causados por rotavírus são muito comuns principalmente em relação à gastroenterites infantis, além disto, existem diferentes combinações possíveis entre os genotipos G e P, permitindo assim a existência de um amplo espectro epidemiológico. Estes pontos contribuem para que o desenvolvimento de uma vacina anti-rotavírus seja um grande desafio (SANTOS & HOSHINO, 2005). Atualmente existem no mercado duas vacinas contra rotavírus, a primeira é a Rotarix® (GlaxoSmithKline Biologicals) que é uma vacina oral atenuada monovalente de origem humana com elevada



imunogenicidade, eficácia e segurança. Outra vacina é a RotaTeq<sup>®</sup> (Merck), que é uma vacina oral, atenuada e pentavalente com rearranjo humano-bovino. No Brasil, foi implementada no calendário oficial de vacinação a partir de março de 2006 a vacina Rotarix<sup>®</sup> do laboratório GlaxoSmithKline Biologicals, no qual é recomendado duas doses aos 2 e 4 meses de idade com intervalo de 4 semanas entre as doses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

## 1.2 Rotavírus

Os rotavírus são vírus icosaédricos, não envelopados e pertencem à Família Reoviridae, gênero *Rotavirus*. A partícula viral mede aproximadamente 70-90 nm de diâmetro e é constituída por 3 camadas protéicas e um genoma com 11 segmentos de RNA fita dupla (dsRNA). Das proteínas codificadas por esses segmentos, sete são estruturais: VP1, VP2, VP3, VP4, VP5, VP6 e VP7 e cinco são não estruturais: NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 e NSP5. A proteína viral não estrutural NSP4 é uma glicoproteína codificada pelo segmento 10 e foi caracterizada como sendo uma enterotoxina viral capaz de induzir diarreia em camundongos jovens. As proteínas VP1, VP2 e VP3 são do nucleocapsídeo, a VP6, do capsídeo interno e o capsídeo externo é formado por VP7 e espículas de VP4, formando um triplo capsídeo (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996) (Figura 1: ARIAS et al., 2001).



**Figura 1.** Representação de uma partícula de rotavírus, com suas respectivas proteínas: VP4, VP7, VP6 e VP2 (ARIAS et al., 2001).

Os rotavírus estão divididos em sete grupos (A, B, C, D, E, F e G), sendo os últimos quatro encontrados apenas em animais (ESTES, 2007). A identificação dos sorotipos/genótipos dos rotavírus é determinada através da análise das proteínas estruturais VP7 e VP4 respectivamente. A classificação dos sorotipos é designada pela especificidade de anticorpos neutralizantes para ambas as proteínas. O sorotipo é denominado sorotipo G, pois a VP7 é uma glicoproteína, já o genogrupo VP4 é denominado P, por esta ser uma proteína susceptível à clivagem por proteases intestinais que promovem sua adsorção aos vilos intestinais (no intestino delgado a proteína VP4 é clivada pela tripsina em VP5 e VP8 e esta clivagem possibilita a adsorção e penetração viral na célula). Quatorze sorotipos G foram determinados por ensaios sorológicos e os genótipos P foram determinados por ensaios moleculares. Ainda com relação aos sorotipos G, dez destes são humanos. Em relação aos genótipos P, 14 destes foram determinados como humanos. Vale ressaltar que podem ocorrer diversas combinações entre os genes que codificam para as proteínas estruturais VP7 e VP4, uma vez que estes se segregam independentemente (SANTOS & HOSHINO, 2005).

A proteína estrutural VP6 é codificada por um gene muito conservado dentre todos os sorotipos/genótipos de rotavírus, como esta pode ser comum à grande maioria dos sorotipos de rotavírus, este gene pode ser usado para a detecção de vários sorotipos, sendo que o iniciador gênico normalmente utilizado flanqueia uma região de 379pb neste gene. Posteriormente o sorotipo específico pode ser determinado com iniciadores para os genes codificadores de VP7 e VP4 (GÓMARA et al., 2002).

A principal forma de transmissão do rotavírus entre outros vírus entéricos é pela via fecal-oral, infectando e replicando primeiramente no trato gastrointestinal, sendo que uma das formas desta transmissão pode ocorrer devido ao lançamento de esgoto não tratado em

águas superficiais e que não são devidamente tratadas para utilização como consumo e recreação, sendo que a probabilidade de infecção pela exposição a uma partícula viral de rotavírus é de 31% e não mais que 1 PFU (unidade formadora de foco) é requerida para causar infecção em 1% de adultos doentes que não possuem anticorpos para este vírus (FONG & LIPP, 2005).

Os rotavírus possuem um tropismo específico, infectando somente enterócitos localizados nas extremidades das microvilosidades intestinais, sugerido que nestas há uma grande quantidade de receptores. Há fortes evidências de que os rotavírus necessitam da presença de ácido siálico na superfície das células, mas isto ainda não está bem confirmado para as cepas de animais (ARIAS et al. 2001). Ainda em relação ao mecanismo de entrada do rotavírus nas células hospedeiras, sabe-se da existência de uma região sensível à tripsina na proteína estrutural VP4. A existência deste sítio de clivagem justifica a aparente dependência da clivagem da VP4 em VP5 e VP8 pela tripsina para a infectividade viral *in vitro* (ARIAS et al. 2001).

O fato de possuir 11 segmentos de RNA fita dupla em seu genoma permite que haja uma alta frequência de rearranjos entre esses segmentos em vírus do mesmo grupo. O que significa que em infecções mistas, ou seja, com diferentes sorotipos, haja uma elevada variação gênica e antigênica (ESTES, 2007).

A distribuição global dos sorotipos dos rotavírus está bem esclarecida em relação ao sorotipo G, sendo os tipos G1, G2, G3 e G4, os comumente encontrados. Recentemente, porém, o sorotipo G9 teve um aumento em relação aos casos diagnosticados em várias partes do mundo, como Austrália, Gana, Índia e Brasil. Diversas combinações P e G são possíveis, sendo as P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3 e P[8]G4 as quatro predominantes, o que compreende cerca de 88,5% dos casos (ESTES, 2007).

A contaminação do ambiente aquático pode também favorecer a veiculação do rotavírus pela ingestão de moluscos bivalves cultivados nestas águas contaminadas. Uma vez que os moluscos bivalves obtêm seu alimento por filtração, eles têm a capacidade de bioacumular em seus tecidos patógenos como o rotavírus entre outros contaminantes presentes nestas águas, tornando-se veículos transmissores de gastroenterites (BUTT et al., 2004).

Estudos demonstram que a persistência da partícula viral do rotavírus e de sua infectividade varia de acordo com o tipo de água que é analisada, apresentando valores diferentes em análises de água de superfície e de águas mais profundas, sendo as primeiras as que apresentam maior contaminação, uma vez que este tipo de águas é mais propenso ao agregamento viral às partículas sólidas em suspensão (ARIAS et al., 2008).

A cepa do rotavírus símio SA11 é de total segurança, uma vez que o rotavírus símio mimetiza com confiabilidade os mesmos efeitos produzidos pela cepa humana deste vírus e, ao mesmo tempo, não confere periculosidade ao manipulador, desde que respeitadas as condições de biossegurança, disponíveis no laboratório.

Métodos para determinar a presença de vírus entéricos em amostras de águas se fazem necessários para monitorar e assegurar um padrão ideal de qualidade no fornecimento de água para a população. Em vários países, métodos para a detecção destes vírus entéricos em águas tratadas e não tratadas constituem uma importante atividade de pesquisa, contribuindo assim para ações epidemiológicas efetivas e abrindo novas perspectivas de controle ambiental em águas tratadas para consumo e irrigação, águas não tratadas, água mineral para consumo, estações balneárias, centros de maricultura que visam o consumo interno e a exportação de bivalves, na vigilância epidemiológica para caracterização dos genótipos circulantes e avaliação do impacto da introdução de futuras

vacinas no ambiente (LINHARES, 2002; STRAUB & CHANDLER, 2003). No Brasil, ainda existem poucos estudos sobre a presença de vírus entéricos humanos em águas de consumo e esgoto (MARQUES, 1991, QUEIROZ et al., 2001).

A detecção de patógenos em águas vem a ser uma importante atividade no controle da poluição destas águas uma vez que a presença de diferentes vírus no ambiente aquático está diretamente relacionada com diferentes surtos de saúde pública registrados em todo o mundo.

O desenvolvimento de técnicas para o monitoramento da presença de vírus entéricos no ambiente aquático iniciou-se na década de 40. Existem diversos métodos de concentração viral e eluição. Os diferentes tipos de filtração para a concentração viral incluem a utilização de membranas eletropositivas ou eletronegativas, filtros com fibra de vidro, floculação ácida, ultracentrifugação. Os métodos de adsorção-eluição mais comumente utilizados são os que interagem com as cargas dos vírus presentes na água, usando trocas sucessivas de pH (FONG & LIPP, 2005).

Evidências indicam que a utilização de membranas eletronegativas é mais eficiente na recuperação viral em amostras de água do mar, uma vez que estas águas possuem muitas cargas positivas (íons cátions), a adsorção do vírus na membrana é facilitada pela interação entre as cargas opostas. Sendo assim, para se obter a mesma eficiência nas demais amostras de águas, um passo importante para a recuperação viral é positivizar estas amostras com íons cátions, de modo a permitir uma adsorção considerável a membrana (KATAYAMA et al., 2002).

Métodos efetivos para a detecção dos diferentes patógenos causadores de gastroenterites poderá contribuir para estudos no âmbito da melhoria da qualidade da água distribuída à população, permitindo também a realização de levantamentos epidemiológicos

de surtos de doenças, bem como o estabelecimento de parâmetros para um melhor uso dos recursos hídricos naturais, notadamente quando nos referimos aos recursos hídricos do Brasil, que correspondem a uma grande parcela dos recursos mundiais.

Após confirmação da presença destes vírus no meio ambiente aquático, torna-se necessário fazer uma análise dos diferentes sorotipos presentes nestas amostras positivas, uma vez que esta análise levará à determinação de quais cepas virais estão circulando na população servida pela água analisada, permitindo medidas epidemiológicas mais efetivas de controle de epidemias.

A detecção de vírus no ambiente aquático é possível através de diferentes metodologias como cultura de células, análises moleculares como a PCR, Multiplex PCR, PCR em Tempo Real e ICC-RT-PCR (Integrated cell culture) (FONG & LIPP, 2005).

O grupo de pesquisa do Laboratório de Virologia Aplicada já possui experiência na detecção de patógenos virais e bacterianos em moluscos (SANTOS et al., 2001; RIGOTTO et al., 2005; SINCERO et al., 2006; CORREA et al., 2007). Atualmente, vêm implementando a metodologia de detecção de patógenos virais em amostras de águas do mar, de consumo e lodo de esgoto, desta forma, com o sucesso desta nova metodologia será consolidado como referência na detecção destes contaminantes em diferentes frentes de trabalho.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Detectar rotavírus em amostras de águas de superfície, através de técnicas moleculares e de cultivo celular.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Produzir os estoques virais de rotavírus sítio SA11 a partir da infecção *in vitro* de células MA104
- Titular os estoques virais por ensaio de imunofluorescência indireta (IFA)
- Padronizar o método de concentração de partículas virais em amostras de águas destilada, água do mar e água de esgoto tratado, semeadas com rotavírus e submetidas à filtração e concentração no sistema CENTRIPREP™
- Padronizar a técnica de RT-PCR para a detecção de rotavírus nas amostras de águas concentradas
- Verificar a viabilidade dos vírus recuperados da filtração através dos ensaios de ICC-RT-PCR (Cultura celular integrada)
- Aplicar a metodologia padronizada em amostras de águas de superfície em oito diferentes pontos de coleta no município de Florianópolis



### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Cultivo de células MA104**

As células utilizadas para produção de um estoque de fluido viral através da infecção *in vitro* foram células MA104 (células de rim embrionário de macaco verde da África). Estas células são permissivas à infecção pelos rotavírus. O crescimento e manutenção das células foi realizado em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> com a utilização de meio essencial mínimo com sais de Eagle (MEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibióticos e antifúngico (PSA-penicilina G 100U/mL/sulfato de estreptomicina 100µg/mL/anfotericina B 0,25µg/mL) e L-glutamina 2mM. As células foram mantidas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3.2 Produção de fluido viral de Rotavírus SA11**

Células MA104 previamente cultivadas até atingirem uma monocamada confluenta foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e inoculadas com estoque viral previamente tratado com tripsina 10µg/mL por 30 minutos a 37°C. Após 1h a 37°C para adsorção viral, o inóculo foi aspirado e adicionou-se à cultura de células infectadas meio de manutenção (MEM) suplementado com 5µg/mL de tripsina e livre de soro. Estas células foram então mantidas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

A replicação viral foi monitorada pela observação de efeito citopático nas células infectadas utilizando-se um microscópio invertido, sendo que o controle negativo consistia

de uma cultura não-infectada. Quando se observou uma destruição de 100% da monocamada celular, as células foram então congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  e descongeladas a  $37^{\circ}\text{C}$  por três vezes, a fim de promover a lise celular de células ainda intactas pela infecção viral e liberar os vírus intracelulares. A suspensão foi transferida para um tubo de 50 mL de capacidade e centrifugada a  $350\times g$  por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , para remoção dos restos celulares. O sobrenadante foi utilizado para novas infecções em células MA104 a fim de obter um estoque viral com alto título. Isto foi observado pela diminuição do tempo para observação de efeito citopático nas células infectadas. Quando esta meta foi atingida, o fluido viral foi titulado, aliquotado em volumes de 2,0 mL e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.3 Titulação do fluido viral infeccioso de rotavírus SA11 por imunofluorescência indireta**

A determinação do título infeccioso de rotavírus SA11 foi realizada pela técnica de imunofluorescência indireta (IFA) (BARARDI et al., 1998). Este método consiste em utilizar células MA104 cultivadas em meio de crescimento durante 24h em câmaras de 8 poços (Lab Tek<sup>®</sup>, NUNC), na densidade de  $3,0 \times 10^5$  cél/mL. O fluido viral de rotavírus SA11 foi diluído seriadamente de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  em meio para infecção na presença de 10 $\mu\text{g}$  de tripsina, e 100 $\mu\text{L}$  de cada uma das diluições foi inoculado nos poços contendo as células em duplicata. Os controles negativos consistiram somente de inoculação com meio de manutenção contendo tripsina. Após adsorção viral, o inóculo foi removido e 300 $\mu\text{L}$  de meio para infecção foram adicionados. As células ficaram sob incubação durante 24h nas mesmas condições de temperatura e atmosfera mencionadas acima.

Após a incubação, o meio foi removido e as células foram lavadas 2X com solução salina (PBS). Em seguida as células foram fixadas à câmara pela adição de 300µL de metanol gelado a -20°C e mantidas por 5min à temperatura ambiente. As células foram então rehidratadas pela adição de 300µL de PBS e incubadas durante 30min com 300µL de solução bloqueadora (PBS, soroalbumina bovina a 1%, GibcoBRL e Tween-20 a 0,05%, BIO-RAD), a fim de inibir reações inespecíficas. A cada poço foram adicionados 100µL do sobrenadante de hibridoma contendo o anticorpo monoclonal Mab60 anti-VP-7 do rotavírus (SHAW et al., 1986), diluído na razão 1:4 em solução bloqueadora. As células foram incubadas por 16h a 4°C.

As células foram então lavadas três vezes com solução bloqueadora e incubadas por 15min em temperatura ambiente com um anticorpo anti-IgG de camundongo, conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma) diluído a 1:100. A seguir, as lâminas foram lavadas três vezes com solução bloqueadora, secas a temperatura ambiente e montadas em solução de montagem [formalina 5%, NaCl 0,25M, DABCO (1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano), pH 8,6, 2,5%]. A análise das lâminas foi realizada em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 40). O título viral foi determinado através da contagem do número de células fluorescentes na maior diluição viral, sendo expresso em unidades formadoras de focos (FFU/mL).

No presente trabalho, obteve-se os títulos das suspensões-estoques de rotavírus SA11 nos valores de  $6,0 \times 10^6$  FFU/mL.

### **3.4 Amostras da águas para padronização**

Previamente à coleta das amostras da águas que foram utilizadas para a detecção de rotavírus no presente trabalho, foram realizadas as devidas padronizações da metodologia de filtração e concentração das partículas virais em três tipos de água: água destilada, água do mar filtrada e água de esgoto tratado. A água do mar filtrada foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Imunologia Aplicada a Aqüicultura (BEG/CCB/UFSC), coordenado pela Profa. Margherita A.A.M. Barraco e a água de esgoto tratado foi coletada diretamente na Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN), com autorização da mesma.

### **3.5 Concentração das amostras de água através do método Centriprep™**

Para a padronização do método de concentração Centriprep™ YM 50 Millipore, amostras de 2L de água destilada, água de esgoto e água do mar, foram semeadas previamente ao processamento com rotavírus SA11 nas concentrações de  $6,0 \times 10^6$  FFU para os dois primeiros tipos de águas e de  $6,0 \times 10^7$  FFU para o último. Os mesmo tipos de amostras foram processadas sem a adição de rotavírus, a fim de comparar e verificar a perda viral causada durante o processamento da amostra.

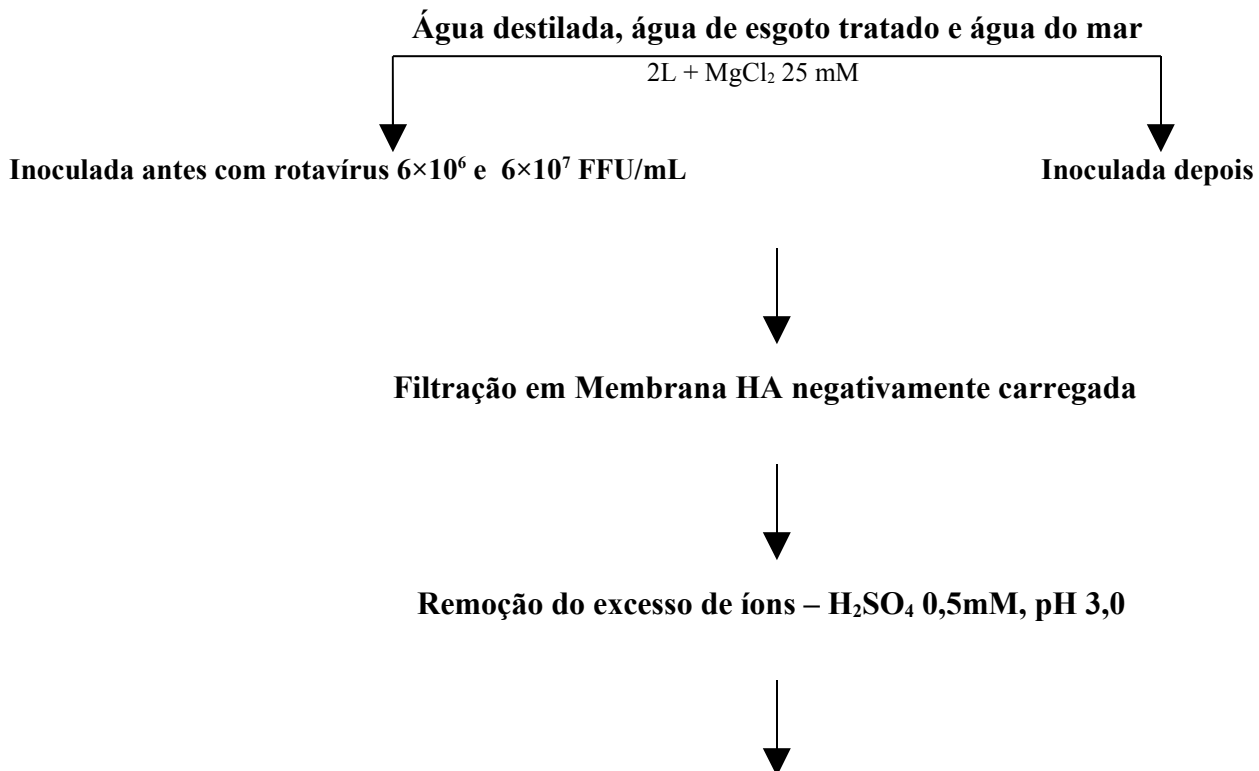
Foi utilizado o método descrito por Katayama et al. (2002) no qual se usa a filtração em membrana carregada negativamente e concentração pelo método Centriprep™. Previamente à filtração, 25mL Cloreto de Magnésio ( $MgCl_2$ ) foi adicionado às amostras de água destilada e água de esgoto semeadas com rotavírus para obter-se uma concentração final de 25mM. Este procedimento é necessário para que as partículas virais naturalmente

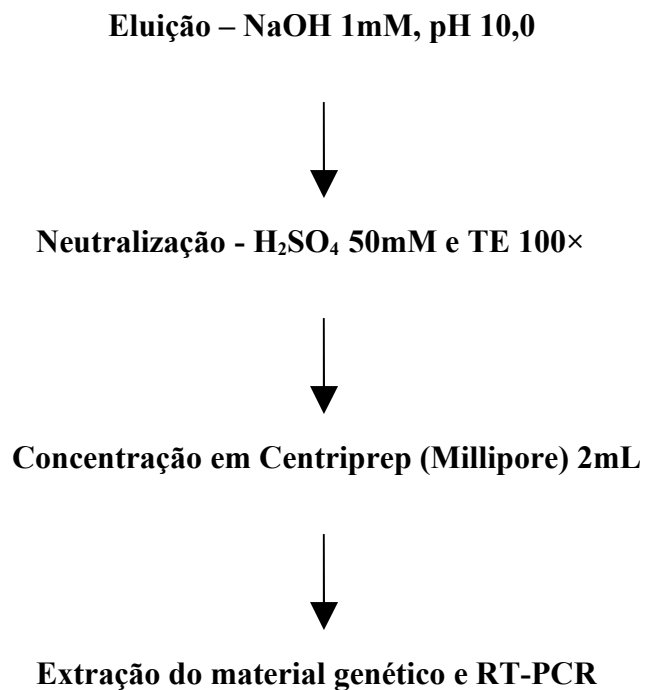
carregadas negativamente sejam positivamente carregadas pela ação dos íons  $Mg^{++}$ , permitindo, deste modo, a retenção das partículas virais positivamente carregadas nas membranas negativamente carregadas durante o processo de filtração da água. Tal procedimento é desnecessário na concentração da água do mar, uma vez que esta já possui grande quantidade de sais. As amostras de 2L foram filtradas através de um sistema a vácuo (Figura 2A) com membrana negativamente carregada (Nihon Millipore) com 90mm de diâmetro e  $0,45\mu m$  de porosidade, com um fluxo de 200mL/min. A membrana foi então lavada com 350mL de uma solução de 0,5 mM  $H_2SO_4$  (pH 3,0) para assegurar a retenção das partículas virais. Em seguida procedeu-se a eluição viral por passagem de 10mL de NaOH 1mM (pH 10,5). O filtrado foi neutralizado com 100 $\mu$ L de solução de 50mM  $H_2SO_4$  e 100 $\mu$ L de 100x tampão Tris-EDTA 1mM (pH 8,0).

A amostra de 10mL foi reconcentrada utilizando Centriprep YM 50 (Millipore) (Figura 2B) que consiste em concentrar as partículas virais em um pequeno volume de amostra através de centrifugação, proporcionando uma detecção viral mais eficiente. As amostras foram centrifugadas a  $1,500\times g$  por 10min a  $4^\circ C$ , obtendo-se um volume final de 2mL (Figura 3).



**Figura 2A e 2B.** Sistema de filtração a vácuo Millipore, Centriprep YM 50 (Millipore)





**Figura 3.** Esquema do protocolo de filtração e concentração das partículas virais padronizado para o rotavírus em amostras de água

### **3.6 Extração do RNA viral a partir da suspensão viral e das amostras de águas concentradas**

O método de extração de ácidos nucleicos descrito por Boom et al. (1990) foi utilizado e consiste na adição de 800µL de uma solução de lise L6 (100mL de Tris-HCl 0,1M, pH 6,4; 22mL de EDTA 0,2M, pH 8,0; 2,6mL de Triton X-100, 120g de isotiocianato de guanidina) em tubos com 400µL da amostra. Após homogeneização em vórtex a amostra foi mantida à temperatura ambiente por 10min. Foram adicionados aos tubos 15µL de sílica (60g de dióxido de silício- Sigma e água deionizada q.s.p. 500mL, pH 2,0) e após agitação no vórtex estas foram mantidas durante 20min a temperatura ambiente

sob agitação constante. Com este procedimento ocorre a lise celular seguida pela adesão dos ácidos nucleicos às partículas da sílica que ficarão na parte inferior do tubo.

A seguir, os tubos foram centrifugados a  $18.000\times g$  por 1min e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 500 $\mu$ L de uma solução de lavagem L2 (100mL de Tris-HCl 0,1M, pH 6,4; 120g de isotiocianato de guanidina), os tubos foram novamente agitados em vórtex e centrifugados a  $18.000\times g$  por 1min. Após o descarte do sobrenadante as amostras foram lavadas mais duas vezes com etanol 70% e acetona respectivamente, da mesma forma como realizado com a solução de lavagem L2.

Os precipitados de sílica onde ficaram aderidos os ácidos nucleicos foram secos em banho-maria em temperatura de 56°C com as tampas dos tubos abertas, a fim de permitir a total evaporação de resquícios de acetona. A sílica foi então ressuspensa em 60 $\mu$ L de água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) e os tubos agitados em vórtex e incubados em banho-maria a 56°C por 15min, com as tampas fechadas. Por fim, a amostra foi centrifugada a  $18.000\times g$  por 3min e coletado 40 $\mu$ L do sobrenadante, no qual estão presentes os ácidos nucleicos.

### **3.7 Padronização do RT-PCR nas amostras de águas concentradas**

Os iniciadores utilizados para os ensaios de RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) foram o VP6-F (+) (5'- GACGGVGCRACTACATGGT- 3') e VP6-R (-) (5'- GTCCAATTCATNCCTGGTGG- 3'), que amplificam um fragmento de 379 pares de bases do gene que codifica a proteína VP6 do capsídeo interno do rotavírus (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2002).



Primeiramente foi obtido o DNA complementar (cDNA) a partir de 5µL do RNA purificado, em uma reação de volume final de 25µL. O RNA foi primeiramente desnaturado a 97°C por 5min e resfriado por 2min em gelo antes de ser adicionado à mistura da reação. Esta reação continha 20pmoles de Iniciador Randômico (Invitrogen), 100U/µL de transcriptase reversa (USB) em condições salinas adequadas e incubação a 42°C por 60min em termociclador.

Para a reação de amplificação gênica (PCR), foram adicionados a um volume final de 25µL, 1U/µL de *Taq* DNA polimerase (Promega), 30pmoles de cada iniciador VP6-F e VP6-R, e condições salinas adequadas. Os tubos foram submetidos a um ciclo de desnaturação de 94°C por 2min, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30seg, hibridização de iniciadores a 58°C por 30seg, extensão a 72°C por 1min e 1 ciclo de elongação a 72°C por 7min.

Como controle positivo de amplificação foram utilizados 5,0µL de RNA purificado a partir de suspensão viral e como controle negativo foi utilizado água no lugar do RNA.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (Tris 89mM-ácido bórico 89mM-EDTA 2mM) sendo corados com brometo de etídeo 0,5µg/mL, visualizados em transluminador UV (Pharmacia) e fotodocumentados com equipamento Kodak Image System.

### **3.8 Ensaio de citotoxicidade das amostras concentradas de águas**

Este ensaio teve como objetivo detectar e determinar em que concentração os diferentes tipos de águas concentradas a partir das amostras de campo apresentaram

citotoxicidade frente às células MA104. Definido o limite de citotoxicidade definido, sabia-se que os efeitos citopáticos observados nas células durante os experimentos de inoculação pelos concentrados de água das amostras de campo que foram positivas para o rotavírus, eram devidos à infecção por vírus viáveis contidos nestas amostras e não devido à possível toxicidade destes concentrados.

Para tanto, células MA104 foram cultivadas na densidade de  $2,0 \times 10^5$  cél/mL em placas de 24 cavidades até atingirem confluência, foram lavadas duas vezes com PBS 1X e sobre elas adicionou-se 250µL das amostras de águas concentradas (amostras negativas para rotavírus), diluídas em meio MEM nas concentrações de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16, além de uma amostra pura. Previamente cada amostra foi tratada com antibióticos PSA (penicilina G 100U/mL/sulfato de estreptomicina 100µg/mL/anfotericina B 0,25µg/mL) na concentração de 150µg/mL. As placas foram então mantidas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e após 1h as amostras foram aspiradas e adicionou-se às células meio MEM de manutenção de acordo com o item 3.2.

Foi realizada a observação em microscópio com a finalidade de identificar possíveis alterações morfológicas celulares (efeito citopático) durante um período de 48h. As placas foram coradas com 200µL de preto de naftaleno, agitadas por 20min e secas para confirmação das observações.

### **3.8.1 Verificação da viabilidade das partículas virais recuperadas pelo ensaio de ICC-RT-PCR (Cultura celular integrada a RT-PCR)**

Células MA104 cultivadas previamente em placas de 24 cavidades como descrito no item anterior, foram lavadas duas vezes com PBS 1X e então se adicionou 200µL das amostras concentradas de água, em diluições não citotóxicas de base 2, diluídas em meio MEM para infecção e suplementado com 10µg/mL de tripsina. Tal procedimento foi realizado somente com as amostras que foram positivas na análise por RT-PCR. As placas foram mantidas por 1h a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e após este período foram novamente lavadas com PBS 1X, a fim de eliminar partículas virais não infecciosas que não penetraram nas células e permaneceram no sobrenadante. Adicionou-se então meio de manutenção MEM suplementado com 5,0µg de tripsina e as placas foram mantidas sob as mesmas condições acima por um período de 48h. Ao final deste período, as placas foram retiradas da estufa e passaram por 3 ciclos de congelamento e descongelamento conforme já descrito. Em seguida, 400µL do sobrenadante foi utilizado para a extração do material genético e reação de amplificação gênica (PCR), como descrito nos itens 3.6 e 3.7. Deste modo, pode-se determinar um limite de detecção confiável, uma vez que a presença dos vírus demonstra sua viabilidade em cultura de células.

### **3.9 Verificação de contaminação viral em águas coletadas (estudo de campo)**

No presente trabalho foram utilizados 8 diferentes tipos de amostras de água ou esgoto, coletadas em diferentes pontos do município de Florianópolis, obtidas mensalmente pelo período de um ano (julho de 2007 a maio de 2008).

Os diferentes pontos de coleta foram:

- Água da Lagoa da Conceição (amostra de uma área de recreação);
- Esgoto despejado na Lagoa da Conceição;
- Esgoto despejado em córrego que corta o bairro do Monte Verde (boca de lobo);
- Água de consumo tratada pela CASAN, coletada numa Creche da PMF, no bairro da Lagoa da Conceição;
- Água de consumo proveniente de fonte natural, coletada na caixa de água comunitária da Marinha no bairro de Sambaqui;
- Esgoto tratado da Estação de Tratamento do Sistema Insular da Baía Sul (CASAN);
- Água do mar proveniente de sítios de cultivo de moluscos, nas comunidades de Sambaqui e Ribeirão da Ilha.

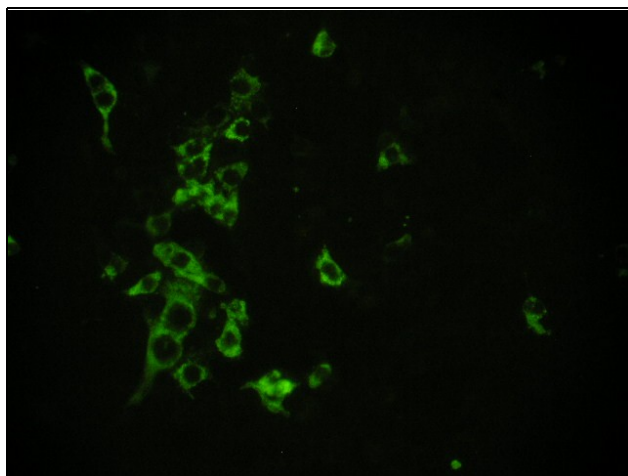
As amostras foram coletadas em um volume de 2L e no laboratório foram filtradas e concentradas como descrito no item 3.5 e então o volume de 2mL do concentrado foi utilizado para posterior extração do material genético e detecção do rotavírus por RT-PCR, ensaios de citotoxicidade e verificação de viabilidade viral pelos ensaios de ICC-RT-PCR.

As amostras de água de consumo proveniente da creche da PMF foram tratadas com 0,1g de tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  Sigma) a 10% final previamente a filtração e concentração, a fim de retirar o cloro presente devido ao tratamento destinado às águas de consumo que poderia inibir a reação de RT-PCR.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Titulação do fluido viral de rotavírus SA11 por imunofluorescência indireta (IFA)

O título do fluido infeccioso do rotavírus símio SA11, utilizando o ensaio de imunofluorescência indireta, foi determinada através da contagem do número de células com fluorescência citoplasmática. Tal procedimento permitiu determinar o título viral que foi de  $6,0 \times 10^6$  FFU/mL (Figura 4).



**Figura 4.** Imunofluorescência de células MA104 infectadas pelo rotavírus símio SA11, incubadas primeiramente com o anticorpo monoclonal MAb60 e posteriormente com um anti-IgG de camundongo conjugado a FITC (isotiocianato de fluoresceína). Aumento 100X

#### **4.2 Padronização do método de concentração e detecção de rotavírus para amostras de água destilada, água do mar e esgoto tratado**

A Tabela 1 mostra a recuperação viral através do método de concentração de amostras de água semeadas com rotavírus de acordo com o descrito em métodos ítems 3.5 e 3.6.

Durante o procedimento de extração do material genético, foram realizadas diluições na ordem de 1:10 a 1:10.000 para água destilada e 1:10 a 1:100 para as demais amostras de água e, após a extração, o material genético foi submetido a RT-PCR.

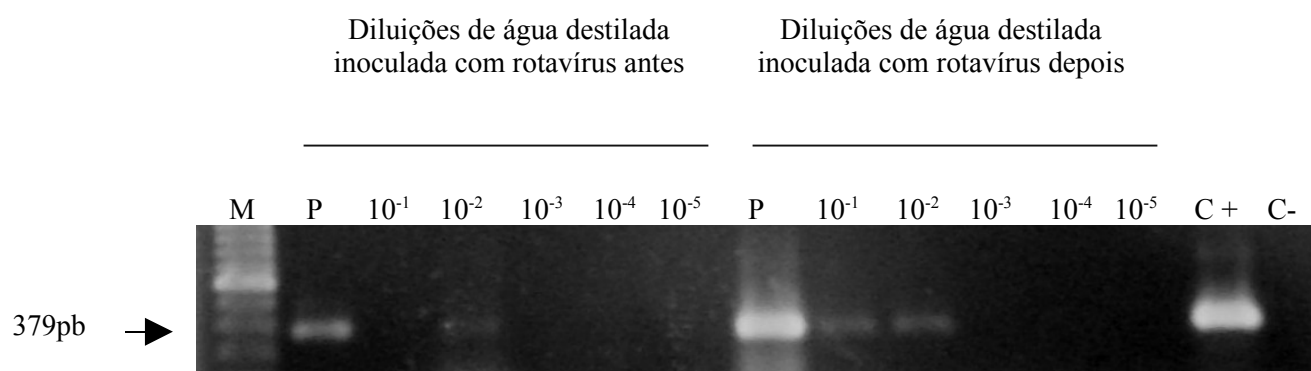
Nas amostras de água destilada, observou-se uma recuperação viral de 100%, ou seja, não se observou diferenças de detecção das partículas virais quando os vírus foram semeados antes ou após o processo de concentração da água. Os rotavírus foram igualmente detectados por RT-PCR tanto nas amostras de ácidos nucleicos não diluídos quanto nas amostras diluídas 1:10 e 1:100 ( Figura 5).

Entretanto, nas amostras de água do mar, a recuperação viral foi de 10%, onde somente a amostra pura apresentou positividade, tanto antes como depois do processamento. E finalmente nas amostras de esgoto tratado não foi detectada uma recuperação eficiente, onde se observou a detecção do genoma do rotavírus apenas na amostras pura inoculada após a concentração (controle positivo). Sendo assim, para este último tipo de água analisada, não foi possível calcular a porcentagem de recuperação real, pois não se pode comparar a perda viral que ocorre durante o processamento das amostras (Tabela 1).

**Tabela 1:** Limite de sensibilidade de detecção de Rotavírus semeado antes e depois em amostras de água (valores em FFU/mL)

Tipo de amostra	Limite de sensibilidade (antes) RT-PCR	Limite de sensibilidade (depois) RT-PCR	Porcentagem de recuperação
Água destilada	80	80	100%
Água do Mar	$8,0 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$	10%
Água de esgoto tratado	ND	$8,0 \times 10^3$	ND

ND: não detectado



**Figura 5.** Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de RT-PCR, em diluições de água destilada inoculada com rotavírus antes e depois de submetidas à filtração e concentração. Legenda: M, marcador de peso molecular 100pb; P, amostra pura; C + controle positivo; C - controle negativo.

### 4.3 Detecção de rotavírus nas amostras de campo

A Tabela 2 mostra os resultados da reação de RT-PCR para a detecção de rotavírus nas amostras de campo coletadas e analisadas entre junho de 2007 a maio de 2008.

**Tabela 2.** Resultados das reações de RT-PCR para a detecção de rotavírus das análises mensais de água coletadas em diferentes pontos do município de Florianópolis.

Amostras								
Mês	Água Lagoa	Esgoto Lagoa	Água Creche	Esgoto Casan	Água Mar Ribeirão	Água Mar Sambaq.	Cx'água Sambaq.	Esgoto Monte Verde
<b>Junho/07</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Julho/07</b>	-	-	-	+	+	-	-	+
<b>Agosto/07</b>	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>Setembro/07</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Outubro/07</b>	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>Novembro/07</b>	-	-	-	+	+	-	-	+
<b>Dezembro/07</b>	-	-	-	+	+	-	-	+
<b>Janeiro/08</b>	+	+	-	+	+	-	-	-
<b>Fevereiro/08</b>	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>Março/08</b>	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>Abril/08</b>	-	-	+	-	-	+	-	-
<b>Maio/08</b>	-	-	-	-	+	-	-	+

( + ) Positivo, ( - ) Negativo



#### **4.4 Citotoxicidade das amostras de águas concentradas**

A avaliação da toxicidade dos diferentes tipos de amostras de águas concentradas (negativas para rotavírus) frente às células MA104 foi realizada em duplicata de acordo com o item 3.8.

Após um período de 48h observou-se toxicidade apenas na amostra pura de Esgoto tratado da Estação de tratamento do Sistema Insular da Baía Sul (CASAN). As demais amostras em suas diferentes concentrações não apresentaram alterações morfológicas celulares consideráveis, em comparação com os controles celulares (dados não mostrados).

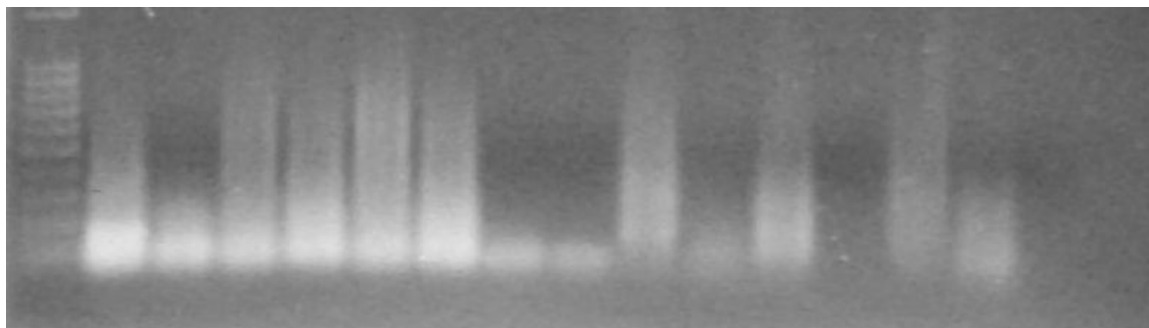
Deste modo, optou-se em usar a diluição 1:2 no ensaio de ICC-RT-PCR para todas as amostras de campo positivas para a presença do genoma de rotavírus na reação de RT-PCR.

#### **4.5 Resultados para a verificação da viabilidade viral pelo ensaio de ICC-RT-PCR**

As 22 amostras de campo que foram positivas para presença do genoma do rotavírus na reação de RT-PCR, foram submetidas ao ensaio de ICC-RT-PCR para verificar a viabilidade viral nestas amostras positivas por RT-PCR. As placas foram mantidas na estufa por 48h e apenas algumas amostras, relativas a amostras de água do mar, apresentaram alterações morfológicas durante as observações realizadas no microscópio.

Após a purificação dos ácidos nucléicos do sobrenadante das amostras analisadas no ensaio de ICC, tais amostras foram submetidas a reação de RT-PCR, onde somente duas amostras apresentaram positividade (Figura 6A e 6B).

M C C C C C HL EL CR Ri Ri Ri Sa Sa Sa Mv



**Figura 6A.** Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de ICC-RT-PCR, das amostras de campo positivas para o genoma de rotavírus. Legenda: M, marcador de peso molecular 100pb; C, esgoto Casan; HL, Água da Lagoa da Conceição; EL, esgoto Lagoa da Conceição; CR, água de consumo da creche; Ri, água do mar Ribeirão da Ilha; As, água do mar Sambaqui; Mv, esgoto do córrego monte Verde.

M Mv Mv Mv Mv Mv Mv Mv C+ C+ C- CC CV

379pb



**Figura 6B.** Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de ICC-RT-PCR, das amostras de campo positivas para o genoma de rotavírus. Legenda: M, marcador de peso molecular 100pb; Mv, esgoto do córrego monte Verde; C+, controle positivo; C-, controle negativo; CC, controle celular; CV, controle viral.

## 5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de métodos com alta sensibilidade na detecção de vírus entéricos no ambiente aquático é de grande importância. Uma vez que a contaminação viral não está correlacionada com a contaminação bacteriana, métodos eficientes são necessários para tornar a detecção de vírus entéricos no ambiente, uma atividade corriqueira e de exigência obrigatória pelos órgãos de fiscalização, a fim de promover o controle da contaminação ambiental por efluentes não tratados e o controle de surtos de doenças veiculadas por vírus presentes em água (FONG & LIPP, 2005).

Neste trabalho, as diferentes procedências das amostras de águas analisadas permitiram verificar que a técnica de concentração viral empregada teve um desempenho distinto com relação às diferentes amostras de águas. Kittigul et al. (2004) obtiveram distintos resultados para a presença de rotavírus em diferentes tipos de amostras, sendo esses resultados de 20% para amostras de água de rio, 26,7% em esgoto de um córrego, 25% em esgoto doméstico bruto e nenhuma amostra positiva para água de consumo. A análise da presença do vírus da hepatite A (HAV) em diferentes tipos de amostras de água, utilizando metodologia semelhante à empregada no presente trabalho, apresentou positivities de 20% para água de rio poluído e água de consumo e nenhuma amostra positiva para água do mar e água mineral comerciável (VILLAR, et al, 2006). Estes são exemplos de trabalhos que também obtiveram resultados distintos de recuperação viral, utilizando, porém, detecção por PCR em tempo real, o que permite uma determinação mais relevante devido a quantificação permitida pelo método.

O emprego de técnicas moleculares para a detecção de vírus em amostras ambientais é muitas vezes dificultado pela presença de inibidores nas amostras após a

concentração (FONG & LIPP, 2005; SHIEH et al., 2008). Este fato traz um impacto importante na eficiência de detecção viral, uma vez que tais amostras ambientais contêm muitos inibidores da reação de RT-PCR, como lipídios e outras substâncias orgânicas em amostras de esgoto (BOSCH et al., 2008), ou o excesso de íons em amostras de água do mar (KATAYAMA; SHIMASAKI; OHGAKI, 2002), contudo é necessária a utilização de metodologias capazes de minimizar a ação de tais inibidores.

O emprego da metodologia descrita por Boom et al. (1990) possui muitas vantagens na eliminação de inibidores de RT-PCR, além de contribuir para uma menor contaminação entre amostras, uma vez que durante o processo de extração dos ácidos nucleicos trabalha-se com várias amostras ao mesmo tempo, o que pode facilitar a contaminação cruzada entre elas (GREENING; HEWITT; LEWIS, 2002; RAJAL et al., 2007). Como as cepas virais circulantes no ambiente aquático possuem uma alta variabilidade, devido à facilidade de mutação do genoma viral, em alguns casos, recomenda-se a escolha de uma região altamente conservada para a amplificação por PCR, além de a utilização de uma extração de material genético eficiente. Pode-se ainda, introduzir-se um controle interno na reação de RT-PCR (BOSCH et al., 2008).

Em relação ao método de filtração e concentração das amostras utilizado neste trabalho, pode-se dizer que a utilização da membrana carregada negativamente é de grande eficácia, pois promove a adsorção das partículas virais nesta através das interações eletrostáticas entre a membrana e as partículas virais que estão sob uma condição alcalina. Ainda em relação ao método de concentração utilizado, a eluição viral realizada com NaOH promove além de uma eficiente remoção das partículas virais da membrana, uma diminuição dos possíveis inibidores da reação de RT-PCR. (KATAYAMA; SHIMASAKI; OHGAKI, 2002). Fuhrmann et al. (2005), utilizou a metodologia de filtração de amostras de

água de consumo e água do mar em membranas carregadas negativamente, com algumas modificações na eluição viral e na extração do material genético, e obteve recuperações de 67% em amostras de água de consumo e de 30% em amostras de água do mar, as justificativas para estes valores são a concordância de fatores que promovem determinada perda viral, como a filtração da amostra, a extração do material genético e a inibição da reação de RT-PCR. Villar et al. (2006), utilizando filtração em membrana carregada negativamente, eluição viral com NaOH e concentração em concentrador comercial obteve um limite de detecção considerável em amostras de água inoculadas com HAV.

A utilização de determinados reagentes que permitam a remoção mais efetiva dos inibidores presentes nas amostras, como o extrato de carne e potietilenoglicol (PEG), neste caso em amostras de esgoto ou lodo, ou NaOH em amostras de águas de superfície, que utilizam basicamente as trocas sucessivas do pH das amostras, promovem uma eluição melhor dos vírus durante o processamento da amostra e contribuem para que os ensaios de PCR sejam mais sensíveis e efetivos. (GREENING; HEWITT; LEWIS, 2002; FONG & LIPP, 2005; SHIEH et al., 2008).

A determinação da porcentagem de recuperação viral para as amostras de água utilizadas na padronização foi calculada com base na estimativa da presença de determinadas quantidades de partículas virais em cada passo do processamento destas durante a concentração. Partindo do princípio de que os valores de partículas virais inoculados às amostras eram conhecidos no início do processamento, foi possível analisar a perda viral durante o processo de concentração das amostras.

A recuperação viral variou de acordo com o tipo de água semeado, sendo os resultados mais significativos em relação à padronização de água destilada, onde esta apresentou uma porcentagem de recuperação de 100%. Este resultado está de acordo com o

fato deste tipo de água possuir uma diminuta presença de inibidores em relação à água do mar e esgoto tratado (FUHRAMM; LIANG; NOBLE, 2005). Já a padronização do método de concentração para água do mar demonstrou uma recuperação de apenas 10%, este resultado sugere que este tipo de amostra pode conter muitos inibidores da reação de RT-PCR, como excesso de íons, pois a detecção não apresentou eficiência maior nem mesmo nas amostras diluídas, além de que segundo Fuhramm et al. (2005), nestes tipos de amostras ocorrem perdas consideráveis de material genético durante a extração. Em relação à padronização da água de esgoto tratado, não pode ser calculado a porcentagem de recuperação uma vez que nas amostras inoculadas antes, não foi possível a detecção do genoma do rotavírus. Isto se deve ao fato de tal amostra apresentar-se muito carregada de inibidores, como lipídeos e outros materiais orgânicos, uma vez que se tratava de uma amostra de esgoto. De acordo com Rajal et al. (2007), independente do volume de água analisado e do método de filtração utilizado, a concentração viral permite concomitantemente um aumento da concentração de inibidores nas amostras.

Uma alternativa para contornar os efeitos dos inibidores e melhorar a sensibilidade de detecção viral, seria a realização de uma padronização com diferentes volumes de águas, ou seja, para amostras provavelmente contaminadas, como a de esgoto tratado, usar-se-iam volumes menores de água e para águas pouco ou não contaminadas (como água de consumo) utilizar-se-iam volumes maiores de água durante a concentração (FONG & LIPP, 2005; RAJAL, 2007).

As amostras coletadas e analisadas por RT-PCR no período de um ano (junho de 2007 a maio de 2008) (Tabela 2) apresentaram alternância nas positivities e comprovam a eficácia do método utilizado. Como era de se esperar, nota-se um predomínio de positividade nas amostras de esgoto tratado da Casan, água do mar na localidade de

Ribeirão da Ilha e esgoto do Córrego do bairro Monte Verde, o que comprova que estas amostras, mesmo com elevadas quantidades de inibidores enzimáticos, possuíam alta contaminação viral, o que possibilitou sua detecção.

Nas amostras de água do mar, além do PCR das amostras puras, realizou-se também uma diluição 1:100 do ácido nucléico isolado, com o objetivo de diluir possíveis inibidores. Porém tal alternativa não aumentou a positividade para estes tipos de amostras, sendo que se detectou apenas uma amostra positiva nestas diluições.

As amostras referentes aos meses antecedentes ao verão e nos meses do verão apresentaram uma positividade elevada 54,54% (12/22). Isto pode estar relacionado com a ocorrência de uma precipitação mais elevada nesses meses, o que demonstra que os locais de coleta das amostras de campo recebem durante as chuvas, descargas de águas provavelmente contaminadas provenientes de outros locais (HOT et al., 2003; GERSBERG, et al., 2006). Porém, o fato de os meses de verão apresentar uma temperatura atmosférica mais elevada se esperaria que a presença de amostras positivas fosse de número inferior, uma vez que altas temperaturas podem causar danos aos capsídeos virais ou aos ácidos nucléicos, inativando muitas vezes enzimas requeridas para a replicação viral (FONG & LIPP, 2005).

Outro fator que pode contribuir para o incremento de contaminantes virais entéricos em águas de superfície no período do verão é em relação ao aumento no número da população neste período do ano quando no referimos ao município de Florianópolis, com isto há uma maior produção de esgoto que muitas vezes não é devidamente coletado e tratado, sendo responsável pela contaminação do ambiente aquático.

A recuperação apresentada nas amostras de campo demonstra que apesar da utilização de pequenos volumes de amostras (2 litros) a recuperação foi significativa,

quando comparada com outras metodologias que utilizam volumes maiores de água, e diferentes tipos de concentração e tratamento para eliminação de inibidores e consequentemente uma detecção mais eficiente (HOT et al., 2003).

A persistência da infectividade viral em amostras de água de superfície pode ser alterada pelo fato de que estes tipos de águas estejam sujeitas a freqüente exposição de raios solares UV (SHIEH et al., 2008). A estabilidade das partículas virais nestas águas pode estar relacionada pela associação destas com partículas sólidas presentes no ambiente aquático, oferecendo assim uma maior proteção contra a degradação viral por enzimas e ação dos raios UV do sol (ARIAS et al., 2008). Porém, a persistência do genoma viral e a infectividade viral podem não estar relacionadas, alguns autores compararam tais parâmetros analisando águas de superfície e águas mais profundas sendo que estas últimas apresentam uma maior estabilidade das partículas virais, tanto em relação à infectividade viral como com a detecção do genoma viral (FONG & LIPP, 2005; ARIAS et al., 2008).

Visando avaliar a viabilidade viral nas amostras de campo positivas para o genoma do rotavírus, realizou-se o ensaio de ICC-RT-PCR. Esta técnica permite a detecção do genoma dos vírus que puderam infectar células cultivadas *in vitro*, garantindo que o genoma detectado pertence a cepas virais viáveis e infecciosas (RIGOTTO; SINCERO; BARARDI, 2005). Os resultados demonstraram a presença de duas amostras positivas. Quando comparado com os ensaios de RT-PCR, onde das 96 amostras de campo analisadas ao longo de um ano de coleta 23% foram positivas, sendo que 9,0% destas apresentaram viabilidade do genoma do rotavírus pelo ensaio de ICC-RT-PCR, conclui-se que nesses tipos de amostras de águas de superfície a viabilidade do vírus é baixa. Entretanto estes resultados de infecciosidade também podem ser falso negativos, devido ao fato de que muitas vezes o ambiente aquático possui altos níveis de determinadas cepas de vírus não



cultiváveis, dificultando desta maneira a detecção na reação de RT-PCR no período de 48 horas (SHIEH et al.,2008). Uma alternativa a este problema, seria a repetição dos ensaios de viabilidade ampliando o tempo em que as amostras permanecem em cultura, analisando-as em diferentes períodos através de visualização microscópica e posteriormente pela realização do ensaio de RT-PCR.

De todas as formas, os ensaios moleculares como o PCR é ainda considerado os métodos mais eficientes para a detecção de contaminação viral no ambiente aquático, visto que é um método rápido e menos dispendioso que os ensaios de cultura celular que apresentam muitas limitações dependendo do vírus a ser detectado.

Como perspectiva, será testada uma nova metodologia de concentração e recuperação de partículas virais em água do mar, utilizando um volume maior de amostra e água do mar artificial. Tal alternativa poderá propiciar uma melhor detecção viral nestes tipos de amostras, tornando-a uma prática rotineira.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho levaram a concluir que:

(1) A padronização do método de filtração e recuperação das partículas virais de rotavírus SA11 demonstrou maior eficiência na amostra de água destilada, uma vez que neste tipo de amostra a porcentagem de recuperação das partículas virais foi de 100%. Nas demais amostras padronizadas, água do mar e esgoto tratado a recuperação viral foi menos eficiente possivelmente, devido à presença de inúmeros inibidores da reação de RT-PCR nestas amostras.

(2) O método de extração de ácidos nucleicos utilizado, demonstrou eficácia na purificação dos ácidos nucleicos do rotavírus e permitiu o trabalho com grande número de amostras com menores chances de contaminação entre estas.

(3) A análise das amostras de campo permitiu que a metodologia padronizada neste trabalho fosse testada com diferentes tipos de águas de superfície, o que torna tal metodologia eficiente no monitoramento viral nestes tipos de amostras, uma vez que permitiu a eliminação de possíveis inibidores da reação de transcrição reversa e PCR mostrando-se uma técnica de grande eficiência na detecção do genoma de rotavírus SA11.

(4) Embora o genoma do rotavírus tenha sido detectado na reação de RT-PCR em diversas amostras ambientais, os ensaios de viabilidade viral para estas amostras de campo positivas, indicam a provável baixa infectividade deste vírus em águas de superfície, ou a existência de determinadas cepas presentes no meio ambiente que não se adaptaram com devida facilidade em cultura celular.

(5) A continuidade deste trabalho, com a realização da reação de PCR em tempo real das amostras de campo analisadas, permitirá a obtenção de melhores respostas, uma vez que a quantificação viral mostrará a real perda que ocorreu durante a utilização do método de filtração e concentração viral.

(6) A repetição dos ensaios de viabilidade viral, utilizando um tempo maior de incubação e a realização de diluições do cDNA para promover a diminuição de possíveis inibidores pode contribuir para se obter melhores resultados em relação a viabilidade e persistência do rotavírus no ambiente aquático.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. A Portaria 518 da ANVISA/MS, de 25 de março de 2004. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/518\\_04.html](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/518_04.html). Acesso em: 20 maio 2008).

ARIAS, C.F.; ISA, P.; GUERRERO, C.A.; MÉNDEZ, E.; ZÁRATE, S.; LÓPEZ, T.; ESPINOSA, R.; ROMERO, P.; LÓPEZ, S. Molecular biology os rotavirus cell entry. **Arch. Med. Res.**, v. 33, p. 356-361, 2001.

ARIAS, C.F.; ESPINOSA, A.C.; HIRIART-MAZARI, M.; ESPINOSA, R.; AVIDAL-MARURI, L.; MÉNDEZ, E. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. **Water Res.**, v. 42, p. 2618-2628, 2008.

ASHBOLT, N.J. Microbial contamination of drinking water and diseases outcomes in developing regions. **Toxicology**. v. 198, p. 229-238, 2004.

BARARDI, C.R.M.; YIP, H.; EMSLIE, K.R.; VESEY, G.; SHANJER, R.S.; WILLIAMS, K.L. Flow cytometry and RT-PCR for rotavirus detection in artificially seeded oyster meat. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 49, p. 9-18, 1998.

BOOM, R.; SOL, C.J.; SALIMANS, M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BOSCH, A.; GUIX, S.; SANO, D.; PINTÓ, R.M. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. **Curr. Op. Biotech.**, v.19, p. 01-07, 2008.

BUTT, A.A.; ALDRIDGE, K.E.; SANDERS, C.V. Infections related to the ingestion of seafood. Part I: Viral and bacterial infections. **Lancet Infect. Dis.**, v. 4, p. 201-212, 2004.

CORREA, A.A.; ALBARNAZ, J.D.; MORESCO, V.; POLI, C.R.; TEIXEIRA, A.L.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Marine Environ. Res.**, v.63, p. 479-489, 2007.

ESTES, M.K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. (eds.) **Fields Virology**. 4<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

FONG, T.T.; LIPP, E.K. Enteric viruses of human and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 69, p. 357-371, 2005.

FUHRAMM, J.A.; LIANG, X.; NOBLE, R.T. Rapid detection of Enteroviruses in small volumes of natural waters by Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 4523 – 4530, 2005.

GESBERG, R.M.; ROSE, M.A.; ROBLES-SIKISAKA, R.; DHAR, A.K. Quantitative detection of hepatitis A virus and enteroviruses near the United States-Mexico border and correlation with levels of fecal indicator bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 7438-7444, 2006.

GREENING, G.E.; HEWITT, J.; LEWIS, G.D. Evaluation of integrated cell culture-PCR (C-PCR) for virological analysis of environmental samples. **J. Appl. Microbiol.**, v. 93, p. 745-750, 2002.

HOT, D.; LEGEAY, O.; GANTZER, C.; CAUDRELIER, Y.; GUYARD, K.; LANGE, M.; ANDRÉOLETTI, L. Detection of somatic phages, infections enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. **Water Res.**, v. 37, p. 4703-4710, 2003.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional de esgotamento sanitário 2000. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 20 junho 2008

ITURRIZA-GÓMARA, M.; WONG, C.; BLOME, S.; DESSELBERGER, U.; GRAY, J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. **J. Virol.**, v. 76, p. 6596-6601, 2002.

KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M. Rotaviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. (eds.) **Fields Virology**. Third Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Press, 1657-1708, 1996.

KATAYAMA, H.; SHIMASAKI, A. & OHGAKI, S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 1033-1039, 2002.

KITTIGUL, L.; EKCHALOEMKIET, S.; UTRARACHKIJ, F.; SIRIPANICHGON, K.; SUJIRARAT, D.; PUNGCHITTON, S.; BOONTHUM, A. An efficient virus concentration method and RT-nested PCR for detection of rotaviruses in environmental water samples. **J. Virol. Methods**, v. 124, p. 117-122, 2004.

LECLERC H.; SCHWARTZBROD L.; DEI-CAS, E. Microbial agents associated with waterborne diseases. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 28, p. 371-409, 2002.

LINHARES, A.C. **Vacina contra rotavirus em Belém, Pará: bases epidemiológicas, inocuidade, imunogenicidade e eficácia**. 2002. Tese de Doutorado Biologia Parasitária – IOC – Fiocruz, Rio de Janeiro.

MARQUES E. A importância do estudo da presença e detecção de vírus em água e alimentos. **In: IV Simpósio Brasileiro de Microbiologia de Alimentos**, 02-05 de abril de 1991; Goiânia/GO. p.129-130.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – PORTAL DA SAÚDE. 03 de março de 2006. Disponível em: <http://www.saude.gov.br>. Acesso em: 16 junho, 2008.

PARASHAR, U.D.; HUMMELMAN, E.G.; BRESEE, J.S.; MILLER, M.A.; & GLASS, R.I. Global illness and death caused by rotavirus disease in children. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, p. 565-572, 2003.

PETROVIC, M.; GONZALEZ, S.; BARCELÓ, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **Trends Analit. Chem.**, v. 22, p. 685-696, 2003.

QUEIROZ A.P.S.; SANTOS, F.M.; SASSAROLI, A.; HÁRSI, C.M.; MONEZI, T.A.; MEHNERT, D.U. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 4614-4618, 2001.

RAJAL, V.B.; McSWAIN, B.S.; THOMPSON, D.E.; LEUTENEGGER, C.M.; WUERTZ, S. Molecular quantitative analysis of human viruses in California stormwater. **Water Res.**, v. 41, p. 4287- 4298, 2007.

RIGOTTO, C.; SINCERO, T.C.M.; BARARDI, C.R.M. Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional-PCR, nested-PCR, and integrated cell culture PCR (ICC-PCR). **Water Res.**, v. 39, p. 297-304, 2005.

SANTOS, N.; HOSHINO, Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. **Rev. Med. Virol.**, v. 15, p. 29-56, 2005.

SANTOS, C.S.; RIGOTTO, C.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M. Improved method for rotavirus detection in oysters using RT-PCR: suitability of commercial PCR kit. **J. Shellfish Res.**, v. 20, p. 997-1002, 2001.

SINCERO, T.C.M.; LEVIN, D.B.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M. Detection of hepatitis A virus (HAV) in oysters (*Crassostrea gigas*). **Water Res.**, v. 40, p. 895-902, 2006.

SKRABER S.; GASSILLOUD B.; SCHWARTZBROD L., *et al.* Survival of infectious poliovirus-1 in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliforms and poliovirus-1 genome. **Water Res.**, v. 38, p. 2927-2933, 2004.

SHAW, R.D.; VO, P.T.; OFFIT, P.A.; COULSON, B.S.; GREENBERG, H.B. Antigenic mapping of the surface proteins of *Rhesus* rotavirus. **Virology**, v. 155, p. 434-451, 1986.

SHIEH, C. Y.C.; WONG, C.I.; KRANTZ, J.A.; HSU, F.C. Detection of naturally occurring enteroviruses in waters using direct RT-PCR and integrated cell culture-RT-PCR. **J. Virol. Methods**, v. 149, p. 184-189, 2008.

STRAUB, T.M. & CHANDLER, D.P. Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. **J. Microbiol. Methods**. v. 53, p. 185-197, 2003.

TREE, J.A.; ADAMS, M.R.; LEES, D.N. Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 2083-2043, 2003.

VILLAR, L.M.; de PAULA, V.S.; DINIZ-MENDES, L.; LAMPE, E.; GASPAR, A.M. Evaluation of methods used to concentrate and detect hepatitis A virus in water samples. **J. Virol. Methods**, v. 137, p. 169-176, 2006.

WYN-JONES, A.P. & SELLWOOD, J. A review: Enteric viruses in aquatic environment. **J. Appl. Microbiol.**, v. 91, p. 945-962, 2001.